

令和元年5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04840

研究課題名(和文) シロアリ腸内共生微生物の獲得・進化機構の解明

研究課題名(英文) Deciphering the mechanism of acquisition and evolution of symbiotic microbes in the termite gut

研究代表者

本郷 裕一 (Hongoh, Yuichi)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：90392117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：シロアリの餌である木片の消化の大部分は、シロアリと1.5億年以上前に共生を開始した腸内原生生物群集が担っているが、それら原生生物の起源や共生に至った過程は未知である。本研究の主目的は、木質分解性原生生物を進化過程で喪失した「高等シロアリ」の一系統群が比較的最近、新規な木質分解性原生生物を再獲得した可能性の検証である。結果、新規原生生物は多様な高等シロアリに共生しているものの、多数の原生生物細胞が見られるのはやはり一系統群のみであること、同原生細胞質が木片で充満していること、同原生生物を含む腸画分はセルロース分解活性を有することなど、今後の研究の基盤となる重要な情報を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、比較的最近、新規に獲得されたと見られるシロアリ腸内微生物を題材とし、その系統と多様性、セルロース分解活性などを明らかにした。シロアリは木材の大害虫であるとともに、自然界では重要な分解者であり、その生理・生態の解明は基礎・応用科学の両面で重要である。本研究により、シロアリが腸内共生微生物を獲得する進化過程の一部が解明され、今後のシロアリ研究の基盤となる情報を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to decipher how termites have acquired their gut microbes that are responsible for digesting dead plant matter (lignocellulose). For this purpose, I focused on one clade of higher termites that has relatively recently re-acquired protists as a dominant component of the gut microbiota after the loss of the original cellulolytic protist assemblages. As a result, my research team revealed that the novel protists are ubiquitous in diverse termite lineages but have become dominant only in the specific termite clade. In addition, we found that the protist cytoplasm is filled with wood particles, and the gut compartment containing the protists showed significant cellulolytic activities. Thus, in this study, we obtained fundamental information on this new group of protists for future studies.

研究分野：分子生態学

キーワード：シロアリ 共生 腸内微生物 原生生物 セルロース 進化 昆虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

シロアリは木材の世界的大害虫である一方、自然界では最も重要な分解者の一つとして地球の炭素循環に大きく貢献している。その高効率な木質分解能力の大部分は、1.5 億年以上にわたり共進化を遂げてきた腸内微生物群集の働きによるものである。この共生微生物群集は(シロアリ1種につき)数種類の原生生物(単細胞真核生物)と数百種類以上の原核生物からなり、大多数がシロアリ腸内に特異的で、腸内微生物を除去するとシロアリは生育できない。つまり、シロアリと腸内微生物群集は絶対的な相利共生関係にある。シロアリ腸内原生生物群集は木質(リグノセルロース)消化の中心であり、後腸内の体積の9割が原生生物細胞で占められている。シロアリ腸内原生生物は相利共生の典型例として、また害虫駆除や木質由来バイオ燃料開発の研究対象として注目され続けているが、培養成功例がほとんど無いため、その生理・生態・進化過程は未だに多くの謎に包まれている。酸素存在下では生育不能(絶対嫌気性)で、シロアリ及びシロアリと最も近縁なキゴキブリの共通祖先によって獲得される以前の生息場所などは、全く不明である。

興味深いことに、シロアリの絶対共生体である腸内原生生物群集は、あるシロアリ系統の進化過程で例外的に喪失し、高等シロアリと呼ばれる分類群に進化した(それ以外の全てのシロアリは下等シロアリと呼ばれる)。高等シロアリは食材性のみならず、共生キノコ栽培性、地衣食性、食草性、食糞性、土壌・腐葉土食性など多様な食性を持つ種群に進化し、熱帯昆虫総重量の1/3近くをも占めるほどに繁栄している。ところが、本来土壌食性と考えられる高等シロアリの一部が新たに腸内原生生物を獲得し、土壌と枯死材の両方を餌にできるように進化した可能性がある(本郷ら、論文未発表)。この新規な腸内原生生物の培養成功例は無く、その機能や系統的多様性などの詳細はほとんど未知であった。

## 2. 研究の目的

本課題は、高等シロアリが新規に獲得した腸内原生生物の生理・生態・進化に関する基盤的情報の取得を目的とする。これは、熱帯・亜熱帯の最優占動物群の一つである高等シロアリの生理・生態・進化の解明のために重要なだけでなく、動物による相利共生微生物の獲得機構解明のモデルケースにもなり得る。シロアリ腸内微生物は、原生生物・原核生物群集のいずれもが1.5億年以上前に共生系を既に確立していたと考えられており、その進化的起源や獲得過程などはもはや解明困難である。しかし、高等シロアリは最も新しく派生したシロアリ分類群であり、その一部の系統群のみが保有する腸内共生原生生物の獲得年代はさらに新しいはずで、共生原生生物の進化的起源の特定なども可能かもしれない。この新規腸内原生生物が属する系統群からは、これまでに宿主動物との相利共生種や木片を餌とする種類は知られておらず、その木質分解能力(遺伝子)の由来も解明したい。新しい木質消化共生系の発見は、木質バイオマス利用のための応用研究に新たなシーズを提供することにもなるであろう。

## 3. 研究の方法

タイ産高等シロアリ2種を主な実験材料として、腸内共生原生生物の細胞数、遺伝的多様性、伝播様式、細胞内構造(電顕)などの基礎データを取得した。また、原生生物細胞を含む腸画分のセルラーゼ活性を測定するとともに、飼育下で原生生物を喪失した同種高等シロアリのセルラーゼ活性も同様に測定した。また、原生生物細胞をマイクロマニピュレータで分離して転写産物解析を行った。さらに、同原生生物の細胞内にはメタン生成アーキアの自家蛍光が観察されることから、16S rRNA 遺伝子配列に基づく同共生メタン菌の分子系統解析も試みた。

体制は、研究代表・本郷が、研究協力者である猪飼桂・研究員ほか大学院生とともに、腸内原生生物の計数、組織学的観察、遺伝的多様性解析に加えてセルラーゼ活性測定と網羅的転写産物解析などを実施した。山田明徳・研究分担者は、タイでのシロアリ採集の他、セルラーゼ活性測定の支援と統計学的解析を担当し、伊藤武彦・研究分担者は、網羅的転写産物の情報解析を支援した。

#### 4．研究成果

2019年5月時点で論文未発表の内容を含んでおり、詳細を一部省いてある。

##### (1) 腸内原生生物の計数と顕微鏡観察

まず、タイ産高等シロアリ2種の後腸内がいずれも原生生物細胞で充満していることを確認した。これらの細胞は通常の顕微鏡観察下では全く動かないが、嫌気条件下では活発に運動を開始した。これは、同原生生物が絶対嫌気性であり、酸素存在下で活動が停止することを示唆している。

原生生物の数と直径を計測したところ、同一の腸内に、形態は酷似するものの、サイズのピークが明瞭に異なる大小2種以上の原生生物がいることが判明した。いずれも細胞内に木片らしきもの、さらにメタン菌特有の自家蛍光を多数確認できた。特に「大」原生生物は大量の木片様固形物を包含しており、各種組織染色でも核の識別が困難なほどであった。透過型電子顕微鏡観察でも木片様物体が細胞質に充満していることが確認できた。

##### (2) 分子系統学的多様性と分布

これら原生生物を1細胞ずつ採取して、18S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析を行ったところ、各シロアリ種に「大」1種、「小」2種が共生することが判明し、分子系統学的な位置を特定できた。さらに、同原生生物の18S rRNA 遺伝子に特異的なPCR用プライマーを設計し、シロアリ各種の試料から遺伝子増幅を試みたところ、多様な高等シロアリ種の腸内に分布していることが判明した。顕微鏡下では上記のタイ産2種が属する系統群のみで観察されるため予想外の結果であったが、これによって、少数ずつ多様なシロアリ種の腸内に分布することが明らかとなった。これは、同原生生物の進化的起源を考察する上で重要な情報である。

##### (3) 酵素活性

当初、原生生物細胞をマニピュレータで収集してセルラーゼ活性を測定する予定であったが、手法上の困難があったため、同原生生物が局在する腸画分での活性を測定した。その結果、有意な活性を検出し、一方、飼育下で同原生生物を喪失した個体の腸画分からは全く検出されなかった。このことから、同原生生物がセルラーゼ活性を有する可能性が極めて高くなった。

##### (4) 転写産物解析

同原生生物の基本的な代謝機能を予測するため、採取した原生生物細胞を用いて転写産物配列をIllumina MiSeqを用いて網羅的に取得した。その結果、木質分解酵素に相同性がある複数種の遺伝子転写産物を検出した。既知の真核生物の配列との類似度は低く、細菌からの水平伝播である可能性が高い。現在、さらに詳細な情報解析を行うとともに、腸内細菌由来ではないことを証明する追加実験を試みている。

以上のように、腸内原生生物の重要な基盤情報の取得に成功し、当初の主な目的をほぼ達成した。今後は、さらに実験・解析を追加して論文を作成するとともに、より多様なシロアリ種における同原生生物の分布とバイオマスを精査する必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

主な論文：

1. Utami Y.D., Kuwahara H., Igai K., Murakami T., Sugaya K., Morikawa T., Nagura Y., Yuki M., Deevong P., Inoue T., Kihara K., Lo N., Yamada A., Ohkuma M., Hongoh Y. (2019) Genome analyses of uncultured TG2/ZB3 bacteria in ‘Margulisbacteria’ specifically attached to ectosymbiotic spirochetes of protists in the termite gut. *The ISME Journal* 13: 455–467 (原著、査読有り)
2. 本郷裕一 (2019) 「材食を可能とするシロアリ腸内多重共生機構の解明」昆虫と自然 (ニューサイエンス社) 54: 35–38 (解説、査読無し)
3. Murakami T., Segawa T., Takeuchi N., Sepulveda G.B., Labarca P., Kohshima S., Hongoh Y. (2018) Metagenomic analyses highlight the symbiotic association between the glacier stonefly *Andiperla willinki* and its bacterial gut community. *Environmental Microbiology* 20: 4170–4183(原著、査読有り)
4. Pramono A.K., Kuwahara H., Itoh T., Toyoda A., Yamada A., Hongoh Y. (2017) Discovery and complete genome sequence of a bacteriophage from an obligate intracellular symbiont of a cellulolytic protist in the termite gut. *Microbes and Environments* 32: 112–117 (原著、査読有り)
5. Izawa K., Kuwahara H., Sugaya K., Lo N., Ohkuma M., Hongoh Y. (2017) Discovery of ectosymbiotic *Endomicrobium* lineages associated with protists in the gut of stotermitid termites. *Environmental Microbiology Reports* 9: 411–418 (原著、査読有り)

〔学会発表〕(計13件)

主な学会(等)発表：

1. (招待講演) Yuichi Hongoh "Multi-layered symbiotic system in the termite gut". 第46回内藤カンファレンス (札幌)(国際学会)(2018.10.3)
2. (ポスタ発表) 猪飼桂, 守川貴裕, 高橋雄大, 守屋繁春, 大熊盛也, 井上徹志, 山田明德, 本郷裕一 「高等シロアリ腸内木質分解原生生物の再獲得の可能性」第1回日本共生生物学会大会(つくば)(2017.11.18)
3. (ポスタ発表) 高橋雄大, 猪飼桂, 守川貴裕, 菅谷快斗, 大熊盛也, 小林正規, 井上徹志, 山田明德, 本郷裕一 「高等シロアリ及びゴキブリ腸内共生原生生物の系統的多様性とその形態」第1回日本共生生物学会大会(つくば)(2017.11.18)
4. (ポスタ発表) 守川貴裕, 猪飼桂, 高橋雄大, 金井英樹, 大熊盛也, 井上徹志, 山田明德, 本郷裕一 「高等シロアリ腸内共生原生生物の多様性と木質分解への寄与」第61回日本応用動物昆虫学会大会(農工大、東京)(2017.3.28)

5. (招待講演) 本郷裕一「シロアリと絶対共生する腸内微生物群集の進化と機能」第27回日本生体防御学会総会シンポジウム(九大)(2016.7.8)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ：<http://www.hongoh.bio.titech.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：山田 明德

ローマ字氏名：Akinori Yamada

所属研究機関名：長崎大学

部局名：水産学部・環境科学総合研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：40378774

研究分担者氏名：伊藤 武彦

ローマ字氏名：Takehiko Itoh

所属研究機関名：東京工業大学

部局名：生命理工学院

職名：教授

研究者番号(8桁)：90501106

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：猪飼 桂(東京工業大学・生命理工学院・研究員)

ローマ字氏名：Katsura Igai

研究協力者氏名：守川 貴裕(東京工業大学・生命理工学院・大学院生)

ローマ字氏名：Takahiro Morikawa

研究協力者氏名：高橋 雄大(東京工業大学・生命理工学院・大学院生)

ローマ字氏名：Yudai Takahashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。